



<p>(51) 国際特許分類6 A61K 35/74, 39/04, 9/07, 47/16, 47/18</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/03724</p> <p>(43) 国際公開日 2000年1月27日(27.01.00)</p>												
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03837</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月16日(16.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/202366</td> <td>1998年7月16日(16.07.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/236148</td> <td>1998年8月21日(21.08.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/236163</td> <td>1998年8月21日(21.08.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/236164</td> <td>1998年8月21日(21.08.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 東 市郎(AZUMA, Ichiro)[JP/JP] 〒005-0012 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号 Hokkaido, (JP) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 林 昭(HAYASHI, Akira)[JP/JP] 〒565-0862 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号 Osaka, (JP) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p>		特願平10/202366	1998年7月16日(16.07.98)	JP	特願平10/236148	1998年8月21日(21.08.98)	JP	特願平10/236163	1998年8月21日(21.08.98)	JP	特願平10/236164	1998年8月21日(21.08.98)	JP	<p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 濱松典郎(HAMAMATSU, Norio)[JP/JP] 〒666-0003 兵庫県川西市丸の内町9-17-203 Hyogo, (JP) 藤永稔夫(FUJINAGA, Toshio)[JP/JP] 〒567-0021 大阪府茨木市三島丘1丁目7-5 Osaka, (JP) (74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/202366	1998年7月16日(16.07.98)	JP												
特願平10/236148	1998年8月21日(21.08.98)	JP												
特願平10/236163	1998年8月21日(21.08.98)	JP												
特願平10/236164	1998年8月21日(21.08.98)	JP												
<p>(54) Title: PREPARATIONS FOR IMMUNOTHERAPY FOR CANCER HAVING BACTERIAL SOMATIC CONSTITUENT AS THE ACTIVE INGREDIENT</p> <p>(54) 発明の名称 細菌の菌体成分を有効成分とする癌免疫療法用製剤</p> <p>(57) Abstract Oil-in-water type emulsion preparations usable as remedies in immunotherapy for cancer which have as the active ingredient a bacterial somatic constituent having an immunopotentiating effect and fundamentally containing oily substances, surfactants and stabilizers; and a process for producing the same.</p>														

(57)要約

免疫賦活作用を有する細菌の菌体成分を有効成分とし、基本的に油状物質、界面活性剤、及び安定化剤を含有する、癌免疫療法剤として使用し得る水中油型エマルジョン製剤及びその製造方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CN	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

細菌の菌体成分を有効成分とする癌免疫療法用製剤

技術分野

- 5 本発明は、免疫賦活作用を有する細菌の菌体成分を有効成分とし、基本的に油状物質、界面活性剤、及び安定化剤を含有する、癌免疫療法剤として使用し得る水中油型エマルション製剤及びその製造方法に関するものである。

背景技術

- 10 微生物死菌、細菌の細胞壁骨格成分 (Cell Wall Skeleton、以下、CWSと略す)、ムラミルジペプチド (MDP)、リポ多糖 (LPS)、マンナン、グルカンおよびこれらの誘導体等の細菌の菌体成分 (場合によっては組換えDNA法により產生されるものを含む) は、免疫賦活作用を有し、例えば実験的腫瘍系およびヒト癌の免疫療法において抗腫瘍活性を示すことが知られている。しかも、菌体成分が、ホモジナイザー等の分散・乳化機により油状物質中に分散され、さら
- 15 に、界面活性剤溶液にて乳化されて水中油型エマルションに製剤化された場合に、上記、免疫賦活作用による抗腫瘍効果や感染防御効果がよく発揮されることが知られている (Cancer Res., 33, 2187-2195 (1973)、J. Nat. Cancer Inst., 48, 831-835 (1972)、J. Bacteriol., 94, 1736-1745 (1967)、Gann, 69, 619-626 (1978)、J. Bacteriol., 92, 869-879 (1966))。

- 20 しかしながら、上記水中油型エマルション製剤は、以下に述べる理由で商業的生産が困難であり、最近、その有用性が益々高く評価されているにも拘わらず (Proc. Japan Acad., 70, Ser. B 205-209 (1994); Proc. Japan Acad., 74, Ser. B 20550-55 (1998))、市場に安定供給できないという課題があった。本発明は、水中油型エマルション製剤の商業的生産を困難にしている種々の障害を克服し、
- 25 上記課題を解決したものである。以下、順次その障害とそれを克服した手段について述べる。

一般に、水中油型エマルション製剤は、経時的な変化が大きく、いずれは油相、水相の2相に分離する運命にある。そこで従来から、エマルションの安定化のために、①微粒子化、②分散媒と分散質の比重差を小さくする、③高分子などを添

加し分散媒の粘度を上昇させる、等の方法が採られて来た。しかし、いずれも、変化に要する時間を延長するのみで、最終的には油相、水相の2相に分離してしまう。

特に、菌体成分を有効成分とする水中油型エマルジョン製剤の場合、CWSを含有することによるエマルジョンの不安定化が認められ、数日で不溶性凝集物の生成が確認されるようになるため、結局、用時調製によって水中油型エマルジョン製剤を調製する以外に方法がなかった。この点を解消するために、糖アルコールや糖類を用いた凍結乾燥製剤化の試みが行われている（特公昭63-1291号）が、この先行技術の製剤品でも、凍結乾燥直後および1ヶ月程度の保存で平均粒子径、粒度分布の変化が大きく認められ、実用化に耐えうる安定性の大幅な改善を達成するには至っていない。

発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、菌体成分を有効成分とする水中油型エマルジョン製剤に適切な安定化剤を添加することにより、該製剤を安定に凍結乾燥でき、保存安定性を向上させることができることを見いだした。すなわち、本発明の水中油型エマルジョン製剤の凍結乾燥製剤は、水等の適当な分散溶媒による再分散を行った場合、凍結乾燥前と同程度の平均粒子径、粒子径分布あるいは濁度（相対吸光度）を保持することができる。また、本発明の凍結乾燥製剤を、例えば、長期に保存した後、同様に水等の適当な分散溶媒に再分散した場合でも、凍結乾燥前と同程度の平均粒子径、粒子径分布あるいは濁度（相対吸光度）を保持することができる。

即ち、本発明に係る第一の課題解決法の要旨は次のように示される。

（1）細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、下記の特徴を有する水中油型エマルジョンを凍結乾燥処理して得られる安定化凍結乾燥製剤：

（a）油滴中に、細菌の菌体成分を含み

（b）単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、

（c）凍結乾燥前後における水溶液中の油滴の粒子径分布及び濁度の変化が大きい。

(2) 水溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である上記(1)記載の安定化凍結乾燥製剤。

(3) 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである上記(1)または(2)記載の安定化凍結乾燥製剤。

5 (4) 安定化剤がアミノ酸またはウレアである上記(1)から(3)のいずれかに記載の安定化凍結乾燥製剤。

(5) 安定化剤がグリシンである上記(1)から(3)のいずれかに記載の安定化凍結乾燥製剤。

10 (6) 細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、下記の特徴を有する水中油型エマルジョンを凍結乾燥処理することからなる安定化凍結乾燥製剤の製造法：

(a) 油滴中に、細菌の菌体成分を含み

(b) 単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、

15 (c) 凍結乾燥前後における水溶液中の油滴の粒子径分布及び濁度の変化が大きい。

(7) 水溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である上記(6)記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

(8) 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである上記(6)または(7)記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

20 (9) 安定化剤がアミノ酸またはウレアである上記(6)から(8)のいずれかに記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

(10) 安定化剤がグリシンである上記(6)から(8)のいずれかに記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

25 細菌の菌体成分を有効成分とする水中油型エマルジョン製剤の商業的生産を困難にしているもう一つの障害は、その免疫賦活作用を保持したまま、大量生産することが極めて困難である、ということである。

即ち、水中油型エマルジョンの従来公知の用時調製の製剤方法(J. Nat. Cancer Inst. 48, 831-835(1972)、J. Bacteriol, 92, 869-879(1966)、Gann, 69, 619-626(1978))を改良し、工業的製造法を確立すべく、まず最初に、使用する油状

物質の量が水に比較して極めて少ないことによる、菌体成分の油状物質中への均一な分散の困難性を解決するために、BCG-CWSの原末を等張液に分散させ、次いで油状物質を加えて分散し、界面活性剤を加えて乳化させる水中油型エマルジョン製剤の製造法が試みられた。この初期検討製剤品では、粒度分布や、顕微鏡下での状態が公知の用時調製の製剤と比べてほとんど同じであるにも拘わらず、生物活性（マウスの腫瘍増殖抑制活性）は失活していた。また、油状物質を除いた製剤品でも、生物活性は同様に失活していた。

このように、細菌の菌体成分を有効成分とする製剤の生物学的な有用性は、製剤内容や製造法に依存して大きな影響を受けるのである。このことは、細菌の菌体成分の水溶液または水懸濁液を単独で投与しても有効な免疫賦活作用を示さず抗腫瘍効果や感染防御効果が得られないが、細菌の菌体成分がホモジナイザー等の分散機により油状物質に分散され、さらに、界面活性剤溶液にて乳化されて水中油型エマルジョンに製剤化された場合には、抗腫瘍効果や感染防御効果が発揮される（Cancer Research, 33, 2187-2195(1973)、J. Nat. Cancer Inst., 48, 831-835(1972)、J. Bacteriol., 94, 1736-1745(1967)、Gann, 69, 619-626(1978)、J. Bacteriol., 92, 869-879(1966)) ことから肯首できることである。

本発明者らは、有効な免疫賦活作用を維持し、かつ大量スケールで上記水中油型エマルジョン製剤を製造するには、菌体成分を油状物質でよく被覆することが必要であり、そのためには有機溶媒を分散補助溶媒として使用することが適切であることを見出した。すなわち、本発明では、免疫賦活作用を有する菌体成分を油状物質と有機溶媒からなる分散補助溶媒の混合液中で分散させることにより、使用する油状物質の量が少ないことによる分散工程の困難性を克服することができた。このように、分散工程で有機溶媒からなる補助溶媒を使用することにより、製造工程中の全体容量のコントロールが可能となり、また、補助溶媒の容量を最終製剤の容量程度にすることで、製造の全工程を通じて、一種類の分散乳化機器で製造することが可能となった。これらにより、菌体成分を有効成分とする水中油型エマルジョン製剤の製造に関してスケールアップが容易となり、医薬品としての開発に道が開かれることとなった。尚、後に詳述する様に、菌体成分が油状

物質で十分に被覆されているか否かはレクチンの添加による凝集反応の有無により知ることができる。

即ち、本発明に係る第二の課題解決法の要旨は次のように示される。

(1) 以下の工程を含有することを特徴とする、細菌の菌体成分が油状物質で被覆され、レクチンを用いた凝集反応が陰性を示す水中油型エマルション製剤の製造法：

(a) 細菌の菌体成分、油状物質、および有機溶媒からなる分散補助溶媒の混合液を攪拌して細菌の菌体成分を分散し、

(b) 分散補助溶媒を留去することにより細菌の菌体成分を油状物質で被覆した油滴を形成後、

(c) 界面活性剤を含む水溶液を加えて乳化させる。

(2) 細菌の菌体成分がBCG-CWSあるいはノカルディア・ルブラのCWSである上記(1)記載の水中油型エマルション製剤の製造法。

(3) 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである上記(1)記載の水中油型エマルション製剤の製造法。

(4) 分散補助溶媒がエタノールまたはトルエンである上記(1)、(2)、または(3)記載の水中油型エマルション製剤の製造法。

(5) 油滴が約100 μ m以下の粒子径に良く分散されている、上記(1)、(2)、(3)または(4)記載の水中油型エマルション製剤の製造法。

上記の第二の課題解決法により、免疫賦活作用を保持したまま、細菌の菌体成分を有効成分とする水中油型エマルション製剤の大量生産が可能となったが、その製造過程に於いて、無視し得ない量の菌体成分がエマルションにならず、不溶性物質として乳化・分散機器等に付着することがわかった。このことは、菌体成分の有効利用という面からは、極めて問題であった。

本発明者らは、油状物質で充分被覆された細菌の菌体成分、具体的にはBCG-CWSを用いて乳化、製剤化の検討を鋭意進めた結果、水中油型エマルション製剤調製後にエマルションにならずに乳化・分散機器の器壁などに残存する不溶性物質は、菌体成分を分散した油状物質が器壁などに強固に付着する性質を有することが原因であることを見出し、また、界面活性剤がこの付着を促進するこ

とも同時に見い出した。そこで、使用する界面活性剤の濃度を工夫し、しかも、乳化工程を粗乳化と本乳化の２段階に分けて行うことで、乳化されずに不溶物として残存する菌体成分の量を激減させることに成功した。即ち、最初の粗乳化では、菌体成分の付着を促進しないような低濃度の界面活性剤を使用して緩やかに
5 攪拌して乳化させ、その後、適宜所望の粒度分布を得るために必要最低限度の界面活性剤を加えて溶液全体の界面活性剤の濃度を調節し、強攪拌することによって所望の乳化製剤を作製するという２段階乳化方法が非常に有効であることを見出したのである。このような本発明の製造法で得られた水中油型エマルジョン製剤では、不溶物として器壁に付着し残存する菌体成分はほとんどなく、使用され
10 た菌体成分がほとんど乳化された製剤中に含まれていることが明らかとなった。即ち、水中油型エマルジョン製剤中の菌体成分の含量は、乳化前の仕込量とほぼ同じ値を示すことが明らかとなった。

従って、本発明に係る第三の課題解決法の要旨は次のように示される。

(１) 以下の工程を包含することを特徴とする、水中油型エマルジョン製剤の製造法：
15

(a) 細菌の菌体成分、油状物質、および分散補助溶媒の混合液を攪拌して細菌の菌体成分を分散し、

(b) 分散補助溶媒を留去した後、

(c) 界面活性剤を含む水溶液を加えて次の２段階乳化を行う：

20 i) 低濃度の界面活性剤を含む水溶液を加えて緩やかに攪拌し粗乳化を行う、

ii) 適宜、所望の粒度分布を得るために、粗乳化溶液の界面活性剤濃度を調整し強攪拌して本乳化を行う。

(２) ２段階乳化において、粗乳化に使用される低濃度の界面活性剤水溶液の界面活性剤の含量が油状物質の１０％以下であることを特徴とする、上記（１）記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。
25

(３) 界面活性剤がポリソルベート８０（Tween80）である、上記（１）または

(２) 記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

(４) 細菌の菌体成分がＢＣＧ－ＣＷＳまたはノカルディア・ルブラのＣＷＳで

ある、上記（１）、（２）または（３）記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

（５）細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである、
上記（１）、（２）、（３）または（４）記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

以下、本発明について詳述する。

本発明の第１の態様は、免疫賦活作用を有する菌体成分、油状物質、界面活性剤、安定化剤等よりなる水中油型エマルジョンを凍結乾燥処理して得られる安定な癌免疫療法用製剤である。

本発明における免疫賦活作用を有する菌体成分としては、微生物死菌や微生物由来のCWS、ムラミルジペプチド（MDP）、リポ多糖（LPS）、マンナン、グルカンおよびこれらの誘導体等が挙げられる。微生物死菌の例としては、ヒト型結核菌の死菌等が挙げられる。CWSの由来微生物としては、マイコバクテリア属、ノカルディア属、コリネバクテリア属等が挙げられる。中でも好ましいものとして、マイコバクテリア属ウシ型結核菌であるBCGおよびノカルディア・ルブラを挙げることができる。これらのCWSは、物理的に細菌を粉砕した後、除核酸、除タンパク、脱脂などの精製工程を経て不溶性残渣として得られ、その製法自体は公知である（J. Nat. Cancer Inst., 52, 95-101(1974)）。なお、菌体成分の濃度は、水中油型エマルジョン製剤において0.1～10mg/mlであることが好ましい。

本発明における油状物質としては、Immunology, 27, 311-329(1974)に記載されているような鉱物油、動植物油が挙げられる。鉱物油としては、流動パラフィン、バイオール(Bayol F)、ドラケオール(Drakeol) - 6VR等が挙げられる。植物油としては、落花生油、ゴマ油、AD-65（落花生油とアラセルとアルミニウムモノステアレートの混合物）等が挙げられる。動物油としては、スクワラン、スクワレンのようなテルペノイド誘導体等が挙げられる。中でも好ましいものとして、ドラケオール6VR、スクワランを挙げることができる。

なお、油状物質の濃度は、水中油型エマルジョン製剤において0.01～30%w/wの範囲が適当であるが、0.01～10%w/wが好ましく、0.0

1～5. 0%w/wがより好ましい。

本発明における界面活性剤としては、医薬品製剤に使用される界面活性剤であれば特に制限されるものではない。例えばリン脂質、非イオン性界面活性剤等を挙げることができる。リン脂質としては、ホスファチジルアミン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、レシチン等を挙げることができる。また、水素添加されたリン脂質も使用することができる。非イオン性界面活性剤としては、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、同モノパルミテート（ポリソルベート40）、同モノステアレート（ポリソルベート60）、同モノオレート（ポリソルベート80）等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類およびソルビタンモノラウレート（Span 20）、同モノパルミネート（Span 40）、同モノステアレート（Span 60）、同モノオレート（Span 80）等のソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。好ましい界面活性剤としては、卵黄ホスファチジルアミン、卵黄レシチン、大豆レシチン、ポリソルベート80を挙げることができる。より好ましいものとして、ポリソルベート80を挙げることができる。

なお、界面活性剤の濃度は、水中油型エマルション製剤において0.01～10%w/wの範囲が適当であるが、0.01～5.0%w/wが好ましい。これら界面活性剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせ使用することができる。

本発明における安定化剤としては、多糖類、アミノ酸、タンパク質、ウレア、塩化ナトリウムが挙げられる。多糖類としては、デキストラン、でんぷん、マルトデキストリン、セルロース、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム等が好ましいものとして挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン、プロリン等の中性アミノ酸が好ましく、より好ましい中性アミノ酸として、グリシンを挙げることができる。タンパク質としては、アルブミン、ゼラチン、コラーゲン等が好ましいものとして挙げられる。これら安定化剤は一種類に限らず、適

宜、数種類を組み合わせ使用することができる。

なお、安定化剤の濃度は、水中油型エマルジョン製剤において0.1～20% w/wの範囲が適当であるが、0.1～10% w/wが好ましい。

本発明に係る凍結乾燥製剤を再分散するために使用される分散溶媒は、エマル
5 ション粒子の分散媒体となるものであり、注射用水（注射用蒸留水）、生理食塩水などが挙げられるが、注射可能な分散溶媒であれば特に限定されない。

本発明では、凍結乾燥品を凍乾ケーキとして形成させるために、必要に応じ賦形剤を添加することができる。また、賦形剤は等張化剤としての役割を兼ねる場合が多い。賦形剤としては、糖類、アミノ酸、ウレア、塩化ナトリウム等が好ましいものとして挙げられる。糖類としては単糖類、二糖類、糖アルコールが挙げ
10 られる。単糖類としては、グルコース、フルクトース等、二糖類としては、マルトース、ラクトース、トレハロース、スクロース等、糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン等を挙げる事が出来る。これら賦形剤は一種類に限らず、適宜、数種類を
15 組み合わせ使用することができる。

なお、賦形剤の濃度は、水中油型エマルジョン製剤において0.1～30% w/wの範囲が適当であるが、1～20% w/wが好ましい。

その他、医薬品製剤に使用しうる酸化防止剤、防腐剤、等張化剤、緩衝剤等を必要に応じて必要な段階で添加することができる。添加濃度としては水中油型エ
20 マルジョン製剤において10% w/w以下で十分な場合が多い。

本発明の凍結乾燥製剤は、凍結乾燥前及び、再分散後の水中油型エマルジョンにおいて、単一ピーク型の粒子径分布を示し、濁度（相対吸光度）変化が大きくないものが好ましく、凍結乾燥前の濁度の50%以下の変化であるものがより好ましい。また、平均粒子径は0.1～20 μ mの範囲にあり、好ましくは、1～
25 10 μ mであり、より好ましくは1～5 μ mである。

本発明に於いて、「単一ピーク型の粒子径分布を示し」とは、乳化が充分になされ、個々の油滴粒子が物性上安定していることを意味し、例えば凍結乾燥前後においても凍結乾燥後も凍結乾燥前の平均粒子径から大きくずれることなく、同様な分布を指し示すことである。また、逆に2相以上のピークを持つ粒子径分布

とは、エマルションの凝集、合一が進んでいる状態にあるということであり、安定なエマルション状態ではないことを意味する。

尚、平均粒子径、粒子分布、濁度は例えば静的光散乱粒度分布測定装置（S A L D 3 0 0 0、島津製作所社製、以下同じ）を使用して測定することができる。

- 5 本発明はまた、上記凍結乾燥製剤の製造法をも提供するものである。その製造法は、まず、凍結乾燥前に細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤、賦形剤、安定化剤等からなる水中油型エマルションを調製する。係る水中油型エマルションは、例えば、前記濃度の油状物質に、同じく前記濃度の菌体成分を添加し、さらに界面活性剤、賦形剤、安定化剤及びその他の添加剤の水溶液を添加した後、例
- 10 例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー、ホモミキサー、超音波ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、アルティマイザー（商品名）、マントンーガウリンホモジナイザー型高圧ホモジナイザー等の分散、乳化機により、前記平均粒子径を有する水中油型エマルションになるまで乳化処理を施す。製造上の都合によっては、水中油型エマルションを調製した後、
- 15 賦形剤、安定化剤等の添加剤を添加しても良い。

次いで、得られた水中油型エマルションを凍結乾燥処理し、最後に通常はバイアル内部を窒素置換し、打栓を行い凍結乾燥製剤を得る。

- 本発明の凍結乾燥製剤は、水等の適当な分散溶媒の添加により速やかに再分散し、かくして凍結乾燥前と同程度の平均粒子径、粒子径分布あるいは濁度を有する水中油型エマルションが再構築される。分散溶媒の液量は、用途によって異なり、特に制限はないが、凍結乾燥前の液量の0.5～2倍量の範囲であればよい。
- 20 本発明の第二の態様は、細菌の菌体成分、油状物質、および有機溶媒からなる分散補助溶媒の混合液を使用することを特徴とする、水中油型エマルション製剤の製造方法である。

- 本発明の第二の態様は、細菌の菌体成分、油状物質、および有機溶媒からなる分散補助溶媒の混合液を使用することを特徴とする、水中油型エマルション製剤の製造方法である。
- 25 本発明の製造方法では、まず免疫賦活作用を有する菌体成分、油状物質および分散補助溶媒の混合液を分散・乳化機器で処理し、その後、分散補助溶媒を留去する。留去後の残渣に、界面活性剤や安定化剤等を含有する等張液を加えて分散・乳化機器で処理し、所望の免疫賦活活性を保持した水中油型エマルションを製造する。

本発明で使用される細菌の菌体成分、特にBCG-CWSやノカルディア・ル
ブラのCWSは、水や有機溶媒に不溶であり、油状物質にも溶解しないものであ
る。特に油状物質は、非常に少量でかつ粘性があるため、菌体成分を直接、均一
に恒常的に分散することは非常に困難であった。しかし、後に除去可能な有機溶
媒を分散補助溶媒として使用することにより、油状物質に直接分散する場合と比
較して、均一な分散液を容易に恒常的に得ることが可能となった。すなわち、有
機溶媒は後に除去することが可能であるため大量に使用可能であり、かつ、粘性
も低いため、分散機器を用いて容易に均一な分散液を恒常的に調製することがで
きる。そして、その状態のまま有機溶媒を除去することにより、菌体成分が均一
に分散した油状物質を得ることができるのである。

このように、有機溶媒からなる分散補助溶媒を使用することにより、良く分散
され、かつ、油状物質で充分被覆された上記菌体成分を安定して得ることが出来
るようになった。例えば、分散補助溶媒のない従来法では、ホッター型ホジナイザーを
使用すると、油が少量であるため、毎回均一にかつ恒常的に良好な分散液を調製
することが困難であったのに対し、分散補助溶媒を用いることで、恒常的に良好
な分散液を調製することができるようになった。このように、本発明の製造方法
によって、菌体成分を油で充分被覆させた良好な分散液を調製するという課題を
工業的に解決することができた。

しかも、分散補助溶媒を適宜選択することにより、分散補助溶媒留去後の上記
菌体成分の粒子径が細かく良く分散されたものを調製することが可能となり、目
視で粗粒子が全く見当たらないものを調製できるようになった（目視で検知され
る粗粒子は通常約100 μ m以上の粒子径を持つものである）。

なお、所望の如く菌体成分が油状物質で充分被覆されているか否かは、後に詳
述するレクチン等を使用する凝集反応を用いて確認することができる。

本発明で使用可能な分散補助溶媒は、窒素気流下、加熱あるいは減圧下などで
簡単に留去可能な有機溶媒が挙げられる。好ましい有機溶媒としては、ICHの
残留溶媒ガイドラインに記載のクラス2、クラス3の溶媒を挙げることができる。
より好ましい溶媒として、例えばトルエン等の芳香族炭化水素、例えばシクロヘ
キサン等の脂肪族炭化水素、例えばジクロロメタン、クロロホルム、トリクロロ

エチレン等のハロゲン化炭化水素、例えばエタノール、イソプロパノール等の低級アルコール、例えば酢酸エチル等の酢酸エステル、例えばエチルエーテル等のエーテル類、例えばアセトン等のケトン溶媒を挙げることができる。更に好ましい溶媒としては、エタノール、イソプロパノール等の低級アルコール、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素、トルエン等の芳香族炭化水素を挙げることができる。最も好ましいものとしては、エタノール、クロロホルム、およびトルエンを挙げることができる。

溶媒を留去するための加熱温度は、溶媒の沸点、蒸気圧に応じて適宜選択することができる。なお、高温になれば菌体成分の失活が生じるため、失活の生じない100℃以下の温度が望ましい。好ましくは80℃以下であり、70℃以下で行うことがより好ましい。

この製造方法で使用可能な水溶液とは、先に述べたエマルション粒子の分散媒体となるものであり、生理食塩水などの等張液や注射用水（注射用蒸留水）などが挙げられるが、注射可能な分散溶媒であれば特に限定されない。また、水溶液を等張にするための等張化剤としては、糖類、アミノ酸、ウレア、塩化ナトリウム等が挙げられる。糖類としては単糖類、二糖類、糖アルコールが挙げられる。単糖類としては、グルコース、フルクトース等、二糖類としては、マルトース、ラクトース、トレハロース、スクロース等、糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン等が挙げられる。これら等張化剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせ使用することができる。なお、等張化剤の濃度は、水中油型エマルション製剤において0.1～30%w/wの範囲が適当であるが、1～20%w/wが好ましい。

その他、医薬品製剤に使用しうる酸化防止剤、防腐剤、緩衝剤等を必要に応じて添加することができる。添加濃度としては水中油型エマルション製剤において10%w/w以下で十分な場合が多い。

本発明の第三の態様は、細菌の菌体成分、油状物質、および分散補助溶媒を混合して菌体成分を分散し、分散補助溶媒を留去した後、2段階乳化を行うことを特徴とする水中油型エマルション製剤の製造方法である。即ち、分散補助溶媒を留去した後、油状物質で充分被覆された菌体成分に、まず低濃度の界面活性剤を

含有する水溶液を加えて分散・乳化機器で穏やかに攪拌し粗乳化処理を行い、次に所望の粒度分布を得るために界面活性剤をさらに加えて溶液全体の界面活性剤の濃度を調整し、分散・乳化機で強攪拌することによって所望の水中油型エマルジョンを製造するものである。

- 5 この２段階乳化法により、使用した細菌の菌体成分を、ほぼ定量的に水中油型エマルジョン製剤に取り込むことができる。

2段階乳化の最初の粗乳化工程においては、界面活性剤濃度が油状物質の約10%以上になれば器具類等への菌体成分の付着が強固になる傾向があるため、ここで使用される界面活性剤の濃度は油状物質の約10%以下であることが望ましい。
10 界面活性剤の使用量は、好ましくは油状物質の0.2～8%の範囲であり、より好ましくは油状物質の1～8%の範囲である。従って、粗乳化工程で使用される低濃度の界面活性剤を含有する水溶液とは、界面活性剤の含有量として使用する油状物質の約10%以下の値を示す水溶液のことである。ただし、粗乳化工程で使用される界面活性剤の濃度は、本乳化工程で使用される濃度をこえない。

- 15 次いで、本乳化工程で使用される界面活性剤は、所望の粒度分布を得るために必要最低限度の量を使用することが必要である。従って、場合によっては粗乳化工程時のままで、また場合によっては、最初の粗乳化工程で使用された界面活性剤濃度より高い濃度に溶液全体の濃度を調整する。溶液全体の界面活性剤濃度の調整に用いられる界面活性剤溶液の濃度としては、少量で調整を行うことが可能
20 であればよく、例えば、ポリソルベート80であれば、約5～約15%濃度の水溶液を用いることができる。一方、本乳化工程では、溶液全体の界面活性剤の量が油状物質の約10%以上であることが必要であり、好ましくは油状物質の約10～約20%の範囲の量となるように、より好ましくは油状物質の約15～約20%の範囲の量となるように界面活性剤の含量を調整する。このように、本乳化工
25 程における界面活性剤濃度の調整とは、所望の粒度分布を有するエマルジョンが調製出来るように界面活性剤濃度を調整することである。

また、本乳化工程後に、適宜必要に応じて、さらに界面活性剤を加えて、より高含量の界面活性剤溶液に調整することもでき、その際、さらに乳化機による攪拌を行うことで粒度分布をシャープなものにすることも可能である。これら水溶

液には必要に応じて適宜安定化剤や等張化剤が加えられていてもよい。また、これら界面活性剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせ使用することができる。

乳化のための攪拌条件は、緩やかな攪拌条件としては、例えば、IKAウルトラタックスT-25（シャフトドライブS25KV-25F）を使用した場合、回転数5000～7000rpmで乳化することが挙げられる。また、強い攪拌条件としては、回転数10000～25000rpmで乳化することが挙げられる。乳化の温度としては、高温であることが望ましいが、水分の蒸発などを考えた場合、40～80℃程度が適当である。但し、使用する界面活性剤がポリオキシエチレンを結合したものである場合、その曇点を考慮した温度を設定することが望ましい。

乳化の時間は、調製するエマルジョンの粒度分布を粒度分布測定器で測定しながら、望む粒度分布が達成される様、適宜選択することが出来る。

本発明の第一の態様で述べた凍結乾燥製剤を溶媒に分散して得られる水中油型エマルジョン製剤、および第二および第三態様で述べた方法で製造された水中油型エマルジョン製剤は、当然免疫賦活作用を有していなければならない。そのためには、記述した様に、細菌の菌体成分が充分油状物質で被覆されていることが必要であるが、被覆が十分であるか否かは、レクチンによる菌体成分の凝集反応を利用して検定することができる。

この検定法は、レクチンと菌体成分の糖鎖（アラビノガラクトン）との間に働く相互作用を利用したものであり、菌体成分が充分被覆されていることは、すなわち糖鎖も同じく充分被覆されていることであり、糖鎖が充分被覆されていれば上記の相互作用は生じない。すなわち、凝集反応が陰性を示す場合、主成分は充分被覆されていることになる。また、菌体成分が油状物質で充分被覆されていることで免疫賦活作用による抗腫瘍効果や感染防御効果が発揮されることを特徴としていることから、レクチン凝集反応に陰性を示すことを指標として生物活性の有無が判定できることになる。

ここでいう凝集反応とは、蛍光顕微鏡、または位相差顕微鏡により目視的に菌体成分の凝集が確認できるものである。例えばBCG-CWS水中油型エマルシ

5 ヨン製剤で凝集反応を示すものは、レクチンを加えると図15に示されるようにエマルションの凝集が目視的に確認できるようになる。従って、凝集反応が陽性である場合は、このような凝集塊が生じることを言う。逆に陰性であるとは、このような凝集塊が生じず、油状物質で被覆された菌体成分がほぼ平均して分散していることを言う。

凝集反応の確認方法としては、本発明に係るエマルション製剤とレクチン（コンカナバリンA）溶液をピペッティングで混合し、25℃で30分以上放置し、位相差顕微鏡などを用いて凝集反応の有無を確認することが挙げられる。その結果は例えば、図10、15に示されるように油状物質を含まない、菌体成分のみ
10 の製剤品（オイル・フリー：参照例2.3）や、公知調製法の改良法（参照例2.2）の場合には、凝集反応が生じる。一方、菌体成分が油状物質で充分被覆されているエマルション製剤の場合には、図12から14に示されるように凝集反応が生じない（実施例2.2、3.1、3.2）。このようにして、凝集反応の有無を観察することで、油状物質での被覆の程度を見分けることができる。

15 本発明の方法で製造される水中油型エマルション製剤は、分散溶媒に再分散した第一態様の凍結乾燥製剤も含め、注射など非経口的に投与することができる。投与形態は、治療目的などにより異なり、特に制限されるものではない。通常用いられる投与形態として例えば、皮下投与または皮内投与用注射剤が挙げられる。

20 投与量、投与回数は対象とする疾患、患者の症状、年齢、体重、性別等によって異なるが、非経口投与の場合、特に注射剤として使用する場合には、通常は成人に対して週1回若しくは4週1回の投与で1回当たり0.1～200 μ gの範囲、好ましくは1～100 μ gの範囲で投与することができる。

図面の簡単な説明

以下、図面について簡単に説明する

25 図1は実施例1.1によって得られた水中油型エマルションの凍結乾燥前と凍結乾燥直後に再分散したものの平均粒子径および粒子径分布を示したものである。

図2は実施例1.2によって得られた水中油型エマルションの凍結乾燥前と凍結乾燥直後に再分散したものの平均粒子径および粒子径分布を示したものである。

図3は参照例1.1によって得られた水中油型エマルションの凍結乾燥前と凍

結乾燥直後に再分散したものの平均粒子径および粒子径分布を示したものである。

図 4 は 5 0℃で保存した製剤を再分散したエマルションの濁度（相対吸光度）の経時的な変化を示したものである（試験例 1. 2）。

5 図 5 は 2 5℃で保存した製剤を再分散したエマルションの濁度（相対吸光度）の経時的な変化を示したものである（試験例 1. 2）。

図 6 は 5 0℃で保存した製剤を再分散したエマルションの平均粒子径および粒子径分布の経時的な変化を示したものである（試験例 1. 3）。

図 7 は 2 5℃で保存した製剤を再分散したエマルションの平均粒子径および粒子径分布の経時的な変化を示したものである（試験例 1. 3）。

10 図 8 は 5℃で保存した製剤を再分散したエマルションの平均粒子径および粒子径分布の経時的な変化を示したものである（試験例 1. 3）。

図 9 は参照例 1. 1 の製剤についての平均粒子径および粒子径分布の経時的な変化を示したものである。

15 図 1 0 は参照例 2. 3 に記載の油状物質を含まない製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

図 1 1 は実施例 2. 1 に記載のエタノール溶媒分散改良法製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

図 1 2 は実施例 2. 2 に記載の製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

図 1 3 は実施例 3. 1 の製剤品の凝集反応評価結果を示す。

20 図 1 4 は実施例 3. 2 の製剤品の凝集反応評価結果を示す。

図 1 5 は参照例 2. 2 に記載の公知調製法の改良法製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

図 1 6 は参照例 2. 1 に記載の公知調製法製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

25 発明を実施するための最良の形態

実施例

以下、実施例、参照例、試験例を挙げて、本発明の三つの態様をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

実施例 1. 1

菌体成分としてマイコバクテリア属BCG菌由来のCWS (BCG-CWS) 4mgを、油状物質としてのスクワラン 20 μ L (0.5%w/w) にPotter-Elvehjem型ホモジナイザーを用いて分散し、その後、0.2%w/w ポリソルベート80/300mM (2.3%w/w) グリシン水溶液 4mLを添加して乳化することにより免疫賦活作用を有する水中油型エマルションを得た。

この水中油型エマルションを4mLバイアルに0.5mLずつ分注し、凍結乾燥を行って本発明の凍結乾燥製剤を得た。凍結乾燥は、共和式凍結乾燥機 (G-1、共和真空社製) を用いて行った。

実施例 1.2

安定化剤として、グリシンの代りにウレアを用いる他は実施例 1.1 と全く同様にして、水中油型エマルション及びその凍結乾燥製剤を得た。

実施例 1.3

菌体成分としてBCG-CWS 1gを用いて、スクワラン32gとトルエン300mLの混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素気流下60℃に加熱しトルエンを留去した。ついで、0.02%w/w ポリソルベート80/4.5%グリシン水溶液1.8Lを添加し、ホモミキサーを用いて粗乳化を行い、さらに200mLの10%w/wポリソルベート80を追加後、本乳化を行い、水中油型エマルションを得た。

この水中油型エマルションをバイアルに5mLずつ分注し、凍結乾燥を行って本発明の凍結乾燥製剤を得た。凍結乾燥は、共和式凍結乾燥機 (G-1、共和真空社製) を用いて行った。

参照例 1.1

安定化剤として、グリシンの代りに先行技術 (特公昭63-1291号) 記載の糖アルコールであるマンニトールを用いる他は実施例 1.1 と同様にして、水中油型エマルション及びその凍結乾燥製剤を得た。

実施例 1.1、1.2 及び参照例 1.1 で用いた構成成分およびその量を表 1 に示す。

表 1

	実施例 1. 1	実施例 1. 2	参照例 1. 1
菌体成分	マイコバクテリア属BCG 菌由来のCWS (BCG-CWS) 4mg	マイコバクテリア属BCG 菌由来のCWS (BCG-CWS) 4mg	マイコバクテリア属BCG 菌由来のCWS (BCG-CWS) 4mg
油状成分	スクワラン 20 μ L (0. 5%w/w)	スクワラン 20 μ L (0. 5%w/w)	スクワラン 20 μ L (0. 5%w/w)
界面活性剤 及び安定化 剤	0. 2%w/wポリソルベート 80/300mM(2. 3%w/w) グリ シン水溶液4mL	0. 2%w/wポリソルベート 80/300mM(2. 3%w/w) ウレ ア水溶液4mL	0. 2%w/wポリソルベート 80/300mM(2. 3%w/w) マン ニトール水溶液4mL

実施例 1. 1、1. 2 及び参照例 1. 1 で得られた凍結乾燥前の水中油型エマル
シオンと凍結乾燥直後再分散して得られた水中油型エマルシオンの吸光度、平均
5 粒子径、粒子径分布を、静的光散乱粒度分布測定装置 (S A L D 3 0 0 0、島津
製作所社製、以下同じ) により測定した。凍結乾燥直後の再分散水中油型エマル
シオンは、凍結乾燥品を注射用蒸留水 0. 5 m l により再分散したものである。
結果を表 2 に示す。

表 2

	平均粒子径		粒度分 布変化 *	吸光度 (相対値)
	凍結乾燥前	凍結乾燥直後		凍結乾燥直後/凍結乾燥前
実施例 1. 1	2. 7 μ m	2. 6 μ m	A	0. 9 5
実施例 1. 2	2. 1 μ m	2. 5 μ m	A	0. 9 0
参照例 1. 1	2. 6 μ m	2. 8 μ m	B	0. 1 5

10 * : 粒度分布変化評価判定 A = 粒度分布変化小、B = 粒度分布変化あり

安定化剤にグリシンを用いた実施例 1. 1、ウレアを用いた実施例 1. 2 では、
図 1 および図 2 で示されるように凍結乾燥前後を比較した場合、平均粒子径、粒
子径分布にほとんど変化が無く、凍結乾燥前の水中油型エマルシオンを復元する
15 ことができた。また、吸光度にも差異が見られず、濁度の変化はほとんどなかつ
た。

一方、安定化剤に先行技術(特公昭63-1291号) に記載されている糖アルコール
であるマンニトールを用いた参照例 1. 1 では、図 3 に示されるように単一ピー
ク型の粒子径分布が崩れてしまい、吸光度でも差異が見られた。

試験例 1.1 生物活性試験

実施例及び参照例に記載の製剤を水により再分散した水中油型エマルジョンについて、マウス腫瘍転移モデル系により生物活性を比較し、凍結乾燥処理により、本発明に係る製剤の生物活性が低下しないことを確認した。

- 5 8週齢のBALB/Cマウス20匹の尾静脈より 2.5×10^4 個/匹のColon26-M3.1腫瘍細胞を投与し、1群5匹の4群に分けた。24時間後、第1群は、何も投与せずコントロールとした。第2群は、BCG-CWSを含まない以外は実施例1.1と同じ水中油型エマルジョン100 μ Lを等量の0.2%ポリソルベート80/300mMグリシン水溶液で希釈したサンプルを尾静脈より投与した。第3群は、実施例1.1に記載の凍結乾燥処理前の水中油型エマルジョン100 μ Lを等量の0.2%ポリソルベート80/300mMグリシン水溶液で希釈したサンプルを尾静脈より投与した。
- 10 第4群は、実施例1.1の凍結乾燥製剤を、注射用蒸留水0.5mLで再分散して得られる水中油型エマルジョン100 μ Lを等量の0.2%ポリソルベート80/300mMグリシン水溶液で希釈したサンプルを尾静脈より投与した。2週間後、開胸し、肺を摘出した後、肺に転移した腫瘍巣数を計数し比較を行った。結果は表3に示すとおりである。
- 15

表 3

	転移抑制率(%) (対対照群1)
第1群 (コントロール)	—
第2群 (BCG-CWS不含製剤)	0
第3群 (実施例1.1：凍結乾燥前のエマルジョン製剤)	52*
第4群 (実施例1.1：凍結乾燥製剤)	51*

* : $p < 0.01$ 、第1群との比較によるt-検定を実施。

- 20 凍結乾燥前後で生物活性の低下は認められず、本発明の凍結乾燥製剤の有用性が示された。

試験例 1.2 安定性試験 1 (比較実験)

実施例1.1で得られた本発明の凍結乾燥製剤及び参照例1.1で得られた凍結乾燥製剤を50℃および25℃で2週間、1ヶ月、2ヶ月、および3ヶ月保存し

た後再分散した水中油型エマルジョンの相対吸光度を測定し、濁度変化を経時的に調べた。結果は、表4、表5および図4、図5に示すとおり、本発明の凍結乾燥剤はいずれの温度においても、長期保存後の吸光度は凍結乾燥前と同程度の値を示し、優れた安定性を示した。

表4

50℃における長期保存結果（相対吸光度）

	凍結乾燥前	凍結乾燥後	50℃×2W	50℃×1M	50℃×2M	50℃×3M
実施例1.1	1.00	0.95	0.95	0.98	1.02	0.98
参照例1.1	1.00	0.37	0.26	0.27	—**	—**

表5

25℃における長期保存結果（相対吸光度）

	凍結乾燥前	凍結乾燥後	25℃×2W	25℃×1M	25℃×2M	25℃×3M
実施例1.1	1.00	0.95	0.96	0.93	0.95	0.98
参照例1.1	1.00	0.37	0.21	0.21	—**	—**

**：検出限界値以下のため測定不能

試験例1.3 安定性試験2（粒子径分布変化測定実験）

実施例1.1で得られた本発明の凍結乾燥剤を、5、25、および50℃で保存し、1ヶ月後または3ヶ月後に再分散し、平均粒子径、粒子径分布の変化を経時的に調べた。結果は表6、および図6、7、8に示すとおりである。

表6

保存温度	平均粒子径（μm）			
	凍乾前	凍乾直後	1M	3M
5℃	2.7	2.6	2.2	2.3
25℃	2.7	2.6	2.2	2.4
50℃	2.7	2.6	2.4	2.6

本発明の凍結乾燥剤は5、25、および50℃いずれの温度においても、その平均粒子径、粒子径分布の顕著な変化を示さず、優れた安定性を示した。

試験例1.4 安定性試験3（粒子径分布変化測定実験）

参照例1.1で得られた凍結乾燥剤を、25および50℃で保存し、1ヶ月

後再分散し、平均粒子径および粒子径分布の変化を調べた。結果は表 7 および図 9 に示すとおりである。

表 7

保存温度	平均粒子径 (μm)		
	凍乾前	凍乾直後	1 M
25℃	2.6	2.8	1.9
50℃	2.6	2.8	1.4

- 5 先行技術(特公昭63-1291号)に安定化剤として記載されている糖アルコールであるマンニトールを使用した場合、25℃、50℃のいずれも、1ヶ月で平均粒子径および粒子径分布に顕著な変化が認められた。

試験例 1.5 抗腫瘍活性評価

- 10 モルモット腫瘍 Line 10 ヘパトーマ細胞はstrain 2 系統のモルモットの腹腔にて継代した。腹腔移植後 11 日目のモルモット腹水を採取し、 2×10^7 cells/ml の細胞濃度となるように HBSS に懸濁した。

- 15 実施例 1.3 で得られた BCG-CWS 凍結乾燥製剤およびビークルは、バイアルに 5 ml の注射用蒸留水を添加し、直ちに約 30 秒間激しく攪拌して復水した。バイアルから 1 ml をセラムチューブに分取し、さらに 1 ml の 1% w/w ポリソルベート 80 を添加して等張液とした。この BCG-CWS 製剤またはビークルそれぞれ 0.8 ml と 0.4 ml の Line 10 腫瘍細胞を混合し、37℃で 10 分間インキュベートした。

- 20 モルモット腹側部の毛をバリカンを用いて剃毛し、26 G 注射針と 1 ml シリンジを用いて、腫瘍細胞と BCG-CWS 製剤混合液 150 μl をモルモット腹側へ 1 群 5 匹で皮内移植した。この 150 μl 中には 1×10^6 cells の腫瘍細胞と 18.5 μg の BCG-CWS 原薬を含んでいた。

- 25 腫瘍移植 35 日後の腫瘍の生着阻止活性により、BCG-CWS の抗腫瘍効果を評価した。その結果 HBSS およびビークルを腫瘍細胞懸濁液に混合して接種した群は全個体で腫瘍の生着が見られたが、BCG-CWS 製剤を混合した群は、5 匹中 3 匹の動物において腫瘍生着阻止が認められた。

表 8 BCG-CWSのLine 10へパトーマ腫瘍生着阻止活性

処理	生着阻止個体数／1群の個体数
HBSS	0／5
ビークル	0／5
BCG-CWS	3／5

本発明によって提供される凍結乾燥製剤は、長期に安定な製剤であり、水等の適当な分散溶媒により再分散することで、抗腫瘍活性を維持した水中油型エマルジョン製剤に復元することができる。本発明の凍結乾燥製剤は抗腫瘍効果や感染防御効果等、免疫賦活作用を有する菌体成分の効能の範囲で用いることができ、患者自身の免疫力を高めることができる。その結果、癌、感染症等の治療に有効な治療剤または予防剤として用いることができる。

実施例 2.1 (分散補助溶媒：エタノール)

菌体成分としてBCG-CWS 4mgを用いて、スクワラン 20 μ l (0.5%w/w) とエタノール4mlの混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素気流下60℃に加熱しエタノールを留去した。ついで、0.2%w/w ポリソルベート80／5%マンニトール水溶液 4mlを添加しPotter-Elvehjem型ホモジナイザーを用い約1000rpm／5分間の乳化を行った後、60℃、30分加温殺菌し、水中油型エマルジョンを得た。

実施例 2.2 (分散補助溶媒：トルエン)

実施例 2.1 で分散補助溶媒として用いられたエタノールの代わりにトルエンを使用する以外は実施例 2.1 と同様に調製し、所望の水中油型エマルジョンを得た。

参照例 2.1 (公知調製法：Cancer Research, 33, 2187-2195(1973)など)

菌体成分としてBCG-CWS 4mgとスクワラン 20 μ l (0.5%w/w) をPotter-Elvehjem型ホモジナイザーに加えて分散し、その後、0.2%w/w ポリソルベート80／5%マンニトール水溶液 4mlを添加し、同ホモジナイザーで乳化した後60℃30分間加温し、水中油型エマルジョンを得た。

参照例 2.2 (公知調製法の改良法)

菌体成分としてBCG-CWS 4 mgと蒸留水 2 mlをPotter-Elvehjem型ホモジナイザーに加えて分散し、原体分散液を調製した。この原体調製液 2 mlと10%マニトール水溶液 2 mlを加えて混合し、スクワラン 20 μ l (0.5% w/w)を加えて同ホモジナイザーで分散した。さらに、10%ポリソルベート 80水溶液 80 μ lを添加し、同ホモジナイザーで乳化した後、60℃、30分加温滅菌して、水中油型エマルションを得た。

参照例 2.3 (オイルフリー公知調製法)

菌体成分としてBCG-CWS 4 mgと0.2%w/w ポリソルベート 80/5%マニトール水溶液 4 mlをPotter-Elvehjem型ホモジナイザーに加えて分散・乳化した後、60℃30分間加温滅菌し、水中油型エマルションを得た。

試験例 2.1 生物活性試験

実施例 2.1～2.2及び参照例 2.1～2.3に記載の水中油型エマルションについて、マウス腫瘍転移モデル系により生物活性を比較し、製剤方法の違いによる生物活性の変化を確認した。

8週齢のBALB/Cマウス5匹を一群として使用した。マウスの尾静脈より 2.5×10^4 個/匹のColon26-M3.1腫瘍細胞を投与し、投与後24時間後に実施例および参照例の製剤品をBCG-CWSとして100 μ g/200 μ l/マウスの割合で投与した。2週間後、開胸し、肺を摘出した後、肺に転移した腫瘍巣数を計数し、コントロールの未処置マウスとの比較を行った。結果を表9に示した。

表 9

製剤品	レクチンとの凝集反応	マウス肺癌転移抑制効果 (%)
未処置		0
実施例 2.1	--	56
実施例 2.2	--	37
参照例 2.1	--	52
参照例 2.2	++	0
参照例 2.3	++	6

注) 表中、--は凝集反応が陰性、++は凝集反応が陽性であることを表す。

試験例 2.2 油による菌体成分の被覆試験

実施例 2. 1、2. 2あるいは参照例 2. 1、2. 2、2. 3で得られた製剤品
(BCG-CWS濃度として、1mg/ml) 200 μ lを使用し、コンカナバ
リンA溶液 (コンカナバリンAの濃度として、1mg/ml : 0. 2mM) 50
 μ lを加えて、25℃で30分以上保持した。反応液を位相差顕微鏡で観察し、
凝集反応の有無を確認した。その結果を表9、図10～12、15、16に示し
た。

表9、図10～12、15、16に示したように、本発明の製造方法で得られ
る製剤品は公知調製法で得られた製剤品と同等の生物活性を有するものであるこ
とが明らかとなった。

実施例 3. 1

菌体成分としてBCG-CWS 100mgを、スクワラン 400mgとト
ルエン30mlの混合液に加え、振とうあるいは超音波により2～5分間分散し
た。その後、窒素気流下で50℃に加熱しトルエンを留去した。次いで、0. 0
2%w/w ポリソルベート80水溶液 100mlを添加し、IKAウルトラタラ
ックスT-25型ホモジナイザー (S25KV-25F) を用い、7000rpm
10分間65℃で粗乳化を行った。その後、10%W/Wポリソルベート80水
溶液600 μ Lを添加し、IKAウルトラタラックスT-25型ホモジナイザー
を用いて15000rpm5分間65℃で本乳化した。本乳化後、さらに、10
%W/Wポリソルベート80水溶液1200 μ Lを添加し、IKAウルトラタラッ
クスT-25型ホモジナイザーを用いて7000rpm10秒間乳化を行い、水
中油型エマルジョンを得た。

実施例 3. 2

菌体成分としてBCG-CWS 500mgを、スクワラン 2gとトルエン5
0mlの混合液に加え、振とうあるいは超音波により2～5分間分散した。その
後、窒素気流下で50℃に加熱しトルエンを留去した。次いで、0. 02%w/w
ポリソルベート80水溶液 500mlを添加し、IKAウルトラタラックスT
-25型ホモジナイザー (S25KV-25F) を用い、7000rpm10分
間65℃で粗乳化を行った。その後、10%W/Wポリソルベート80水溶液3m
Lを添加し、IKAウルトラタラックスT-25型ホモジナイザーを用いて15

000rpm10分間65℃で本乳化した。本乳化後、さらに、10%W/Wポリソルベート80水溶液6mLを添加し、IKAウルトラタラックスT-25型ホモジナイザーを用いて15000rpm5分間乳化を行い、水中油型エマルションを得た。

5 実施例3.3

菌体成分としてBCG-CWS 500mgを、スクワラン 20gとトルエン 300mlの混合液に加え、振とうあるいは超音波により15分間分散した。その後、窒素気流下で60℃に加熱しトルエンを留去した。次いで、0.02%ポリソルベート80/10%グリシン水溶液 900mlを添加し、ホモミキサーを用いて7000rpm、10分間、粗乳化を行い、さらに17mLの10%W/Wポリソルベート80水溶液を添加後、12000rpm、10分間本乳化した。本乳化後、さらに、10%W/Wポリソルベート80水溶液83mLを添加し、ホモミキサーを用いて3000rpm、5分間混合を行い、水中油型エマルションを得た。

15 参照例3.1 (一段階乳化法、分散溶媒なし)

菌体成分としてBCG-CWS 4mgとスクワラン 20 μ l (0.5%w/w)をPotter-Elvehjem型ホモジナイザーに加えて分散し、その後、0.2%w/wポリソルベート80水溶液 4mlを添加し、同ホモジナイザーで乳化し、水中油型エマルションを得た。

20 参照例3.2 (一段階乳化法、分散溶媒：トルエン)

スクワラン400mgを含有するトルエン30mLに、菌体成分としてBCG-CWS 100mgを加え、超音波により分散した。窒素還流によりトルエンを除去した後、0.2%w/wポリソルベート80水溶液100mLを添加し、乳化機 (IKA T-25/S25KV25Fシャフト使用)により、15000rpm、5min、70℃にて乳化し、水中油型エマルションを得た。

25 試験例3.1 (BCG-CWS原薬の製剤品中への取り込み率)

実施例3.1、参照例3.1、3.2の製剤品200 μ Lを試験管に取り、5%フェノール水溶液200 μ Lを添加し攪拌する。濃硫酸1mLをさらに添加して攪拌した後、室温にて30分以上放置し、490nmにて吸光度を測定する。得られ

た吸光度から、予め作製した検量線を基にBCG-CWS原薬の量を計算する。
 (生化学実験講座4 糖質の化学 下 P.370、Methods in Enzymology, 8, 93)
 その結果を以下の表10に示す。

表10

製剤製造方法	製剤中の原薬量 (対仕込値%)
参照例3.1	49
参照例3.2	16
実施例3.1	113
実施例3.2	119

この表より示されるように、本発明の製造法で得られた製剤品の原薬取り込み率はほぼ定量的であると考えられる。このように、本発明の製造方法により、製造中の不溶性物質の発生を抑制でき、原薬のロスを少なくできることが明らかとなった。

試験例3.2 BCG-CWS原薬の製剤品中への取り込み率

実施例3.3の製剤品中へのBCG-CWS原薬の取り込み率を、試験例3.1に記載の方法にて測定した。その結果、製剤中の原薬量(対仕込値%)は109%であった。

試験例3.3 生物活性試験

実施例3.1～3.2及び参照例3.1～3.2に記載の製剤を水により再溶解した水中油型エマルジョンについて、マウス腫瘍転移モデル系により生物活性を比較し、製剤方法の違いによる生物活性の変化を確認できる。

8週齢のBALB/Cマウス5匹を一群として使用する。マウスの尾静脈より 2.5×10^4 個/匹のColon26-M3.1腫瘍細胞を投与し、24時間後に実施例および参照例の製剤品をBCG-CWSとして $100 \mu\text{g} / 200 \mu\text{l}$ /マウスを投与する。2週間後、開胸し、肺を摘出した後、肺に転移した腫瘍巣数を計数し比較を行うと、本発明の製剤品はいずれも生物活性を示す。

本発明の製造方法は、含有される菌体成分の有効な免疫賦活作用を維持し、かつ大量スケールで生産可能な製造方法である。近年見直しが進みつつある免疫賦活療法、特に、BCG-CWSを用いる単独療法は特に優れた効果を挙げつつあ

り、 本発明の製造方法により、初めて医薬品として有効な免疫賦活作用を維持した製剤品を提供することが可能となった。

請 求 の 範 囲

1. 細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、以下の特徴を有する水中油型エマルジョンを凍結乾燥処理して得られる安定化凍結乾燥製剤：
5

(a) 油滴中に、細菌の菌体成分を含み

(b) 単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、

(c) 凍結乾燥前後における水溶液中の油滴の粒子径分布及び濁度の変化が大きい。

10 2. 水溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である請求項1記載の安定化凍結乾燥製剤。

3. 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである請求項1または2に記載の安定化凍結乾燥製剤。

15 4. 安定化剤がアミノ酸またはウレアである請求項1から3のいずれかに記載の安定化凍結乾燥製剤。

5. 安定化剤がグリシンである請求項1から3のいずれかに記載の安定化凍結乾燥製剤。

20 6. 細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、以下の特徴を有する水中油型エマルジョンを凍結乾燥処理することからなる安定化凍結乾燥製剤の製造法：

(a) 油滴中に、細菌の菌体成分を含み

(b) 単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、

(c) 凍結乾燥前後における水溶液中の油滴の粒子径分布及び、濁度の変化が大きい。

25 7. 溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である請求項6記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

8. 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである請求項6または7記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

9. 安定化剤がアミノ酸またはウレアである請求項6から8のいずれかに記載

の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

10. 安定化剤がグリシンである請求項6から8のいずれかに記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

11. 以下の工程を含有することを特徴とする、細菌の菌体成分が油状物質で被覆され、レクチンを用いた凝集反応が陰性を示す水中油型エマルジョン製剤の製造法：

(a)細菌の菌体成分、油状物質、および分散補助溶媒の混合液を攪拌して細菌の菌体成分を分散し、

(b)分散補助溶媒を留去することにより、細菌の菌体成分を油状物質で被覆した油滴を形成後、

(c)界面活性剤を含む水溶液を加えて乳化させる。

12. 細菌の菌体成分がBCG-CWSあるいはノカルディア・ルブラのCWSである請求項11記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

13. 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである請求項11記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

14. 分散補助溶媒がエタノールまたはトルエンである請求項11から13のいずれかに記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

15. 油滴が約100 μ m以下の粒子径となる様に分散されている、請求項11から14のいずれかに記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

16. 以下の工程を包含することを特徴とする、水中油型エマルジョン製剤の製造法：

(a)細菌の菌体成分、油状物質、および分散補助溶媒の混合液を攪拌して細菌の菌体成分を分散し、

(b)分散補助溶媒を留去した後、

(c)界面活性剤を含む水溶液を加えて次の2段階乳化を行う：

i) 低濃度の界面活性剤を含む水溶液を加えて緩やかに攪拌し粗乳化を行う、

ii) 適宜、所望の粒度分布を得るために、粗乳化溶液の界面活性剤濃度を調整し強攪拌して本乳化を行う。

17. 2段階乳化において、粗乳化に使用される低濃度の界面活性剤水溶液の界面活性剤の含量が油状物質の10%以下であることを特徴とする、請求項16記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

5 18. 界面活性剤がポリソルベート80 (Tween80) である、請求項16または17記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

19. 細菌の菌体成分がBCG-CWSまたはノカルディア・ルブラのCWSである、請求項16から18のいずれかに記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

10 20. 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである、請求項16から19のいずれかに記載の水中油型エマルジョン製剤の製造法。

1/8

図 1

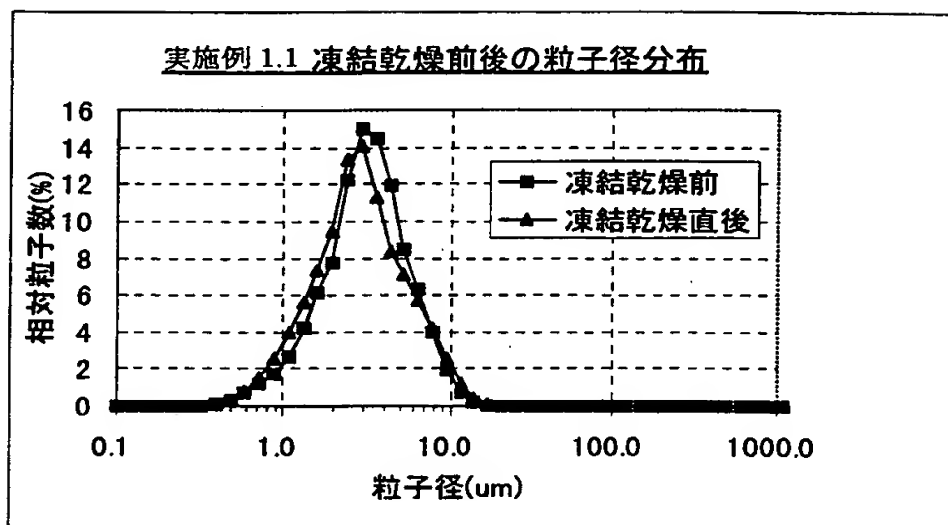
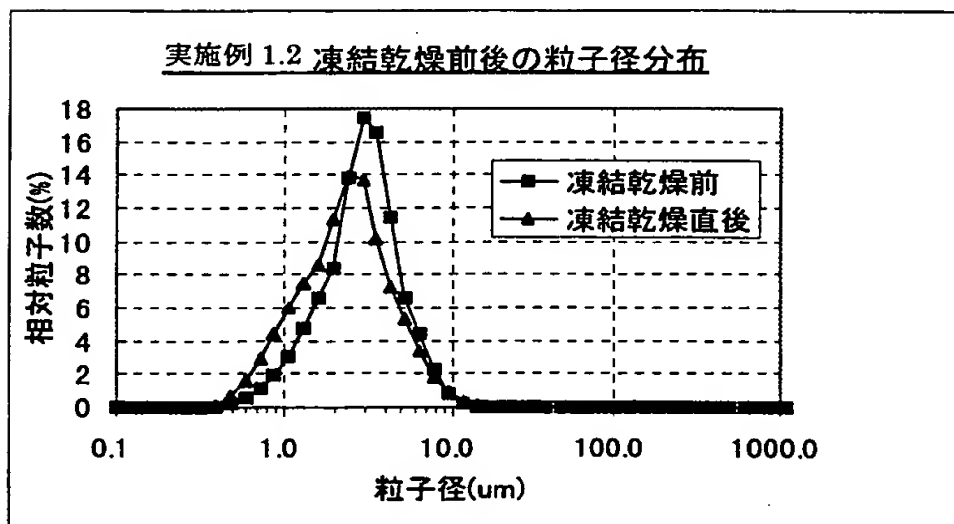


図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/8

図 3

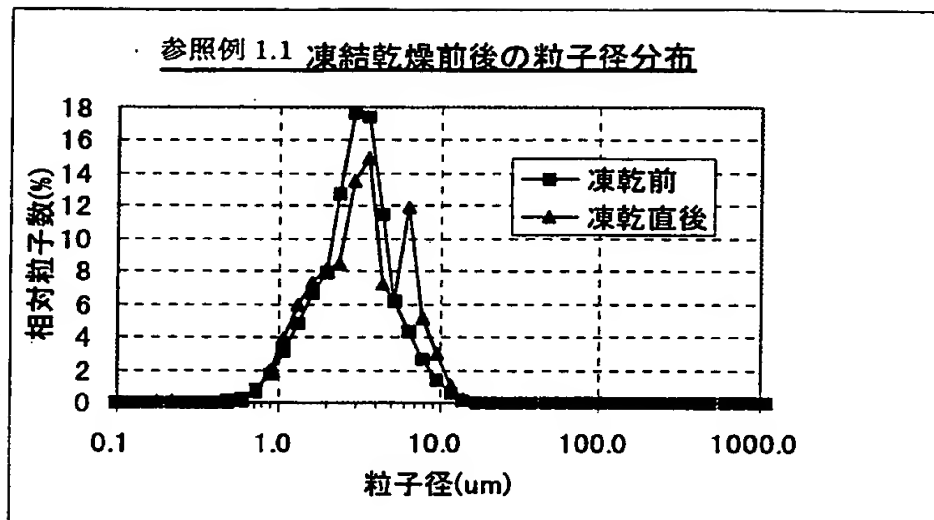
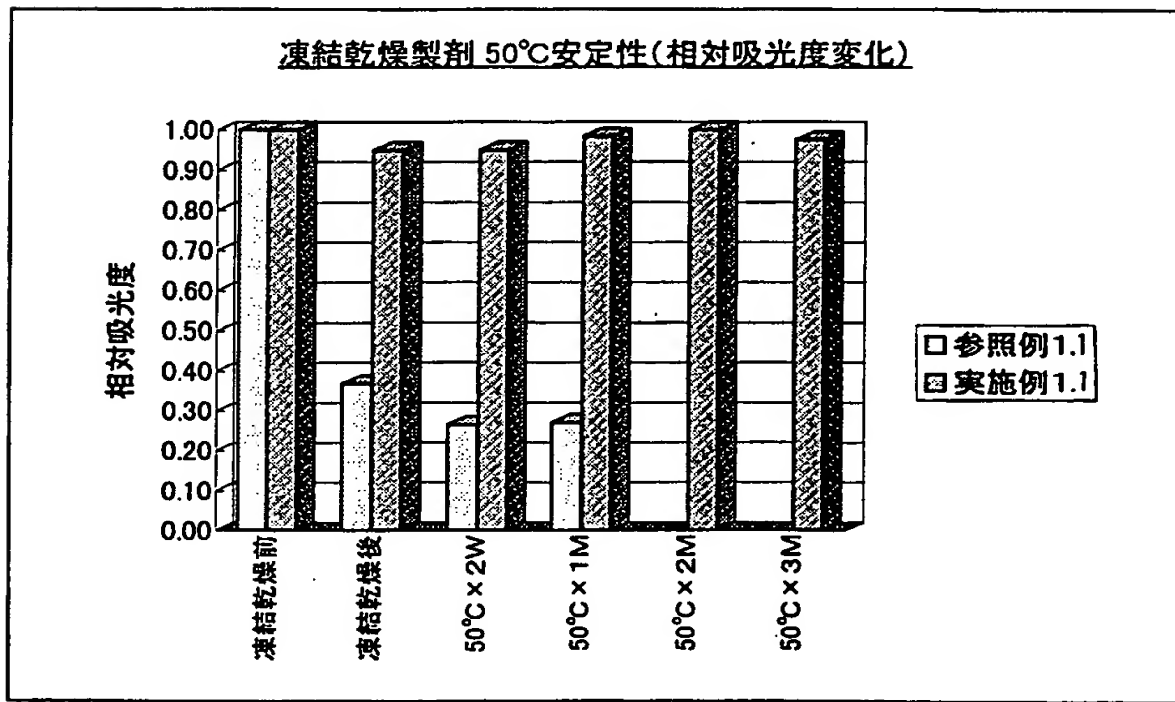


図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/8

图 5

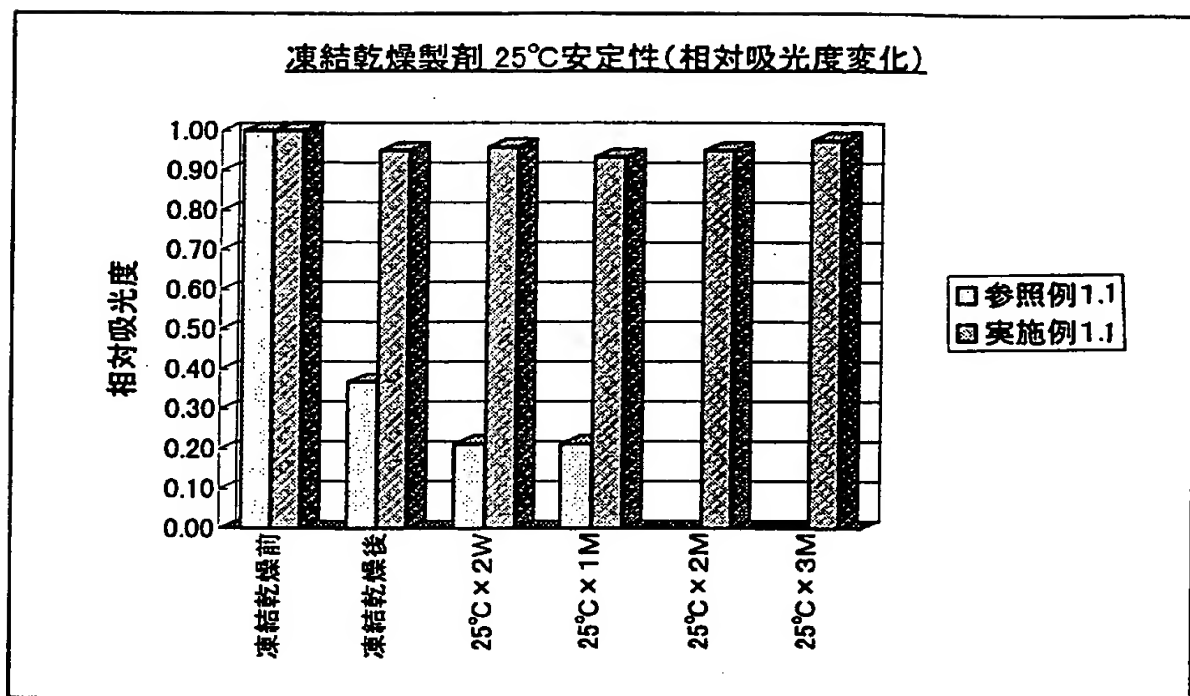
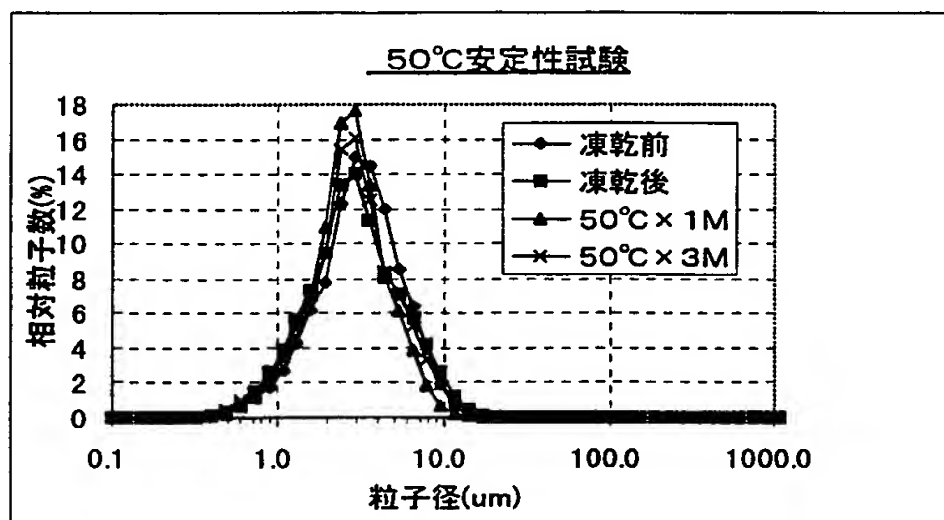


图 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/8

図 7

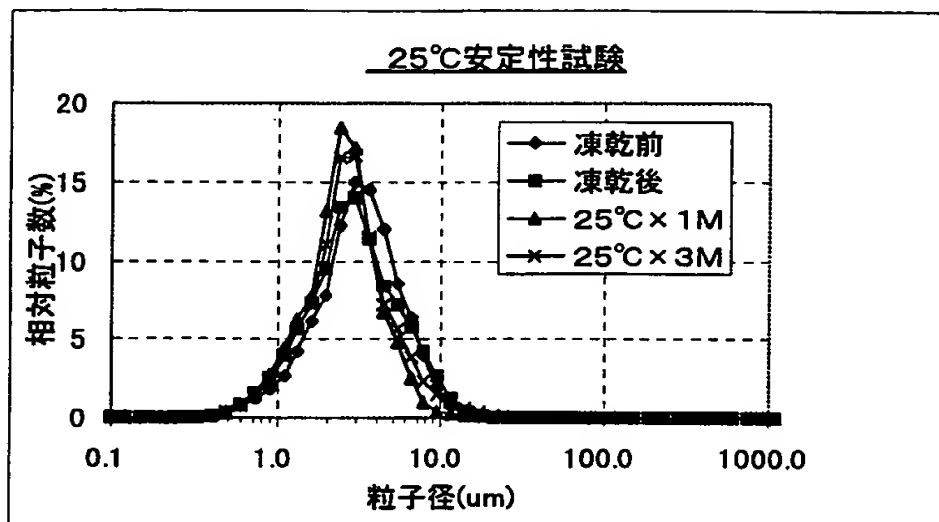
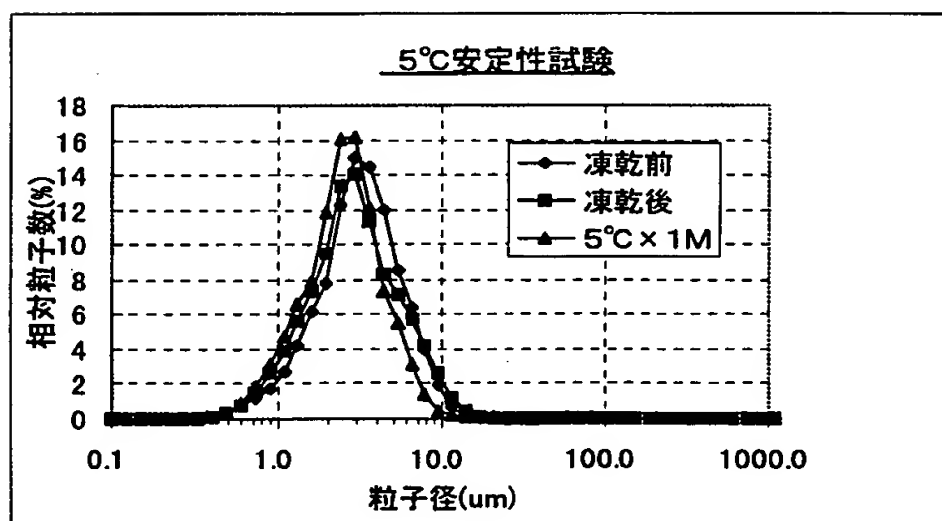


図 8



THIS PAGE BLANK (US: . . .)

5/8

図 9

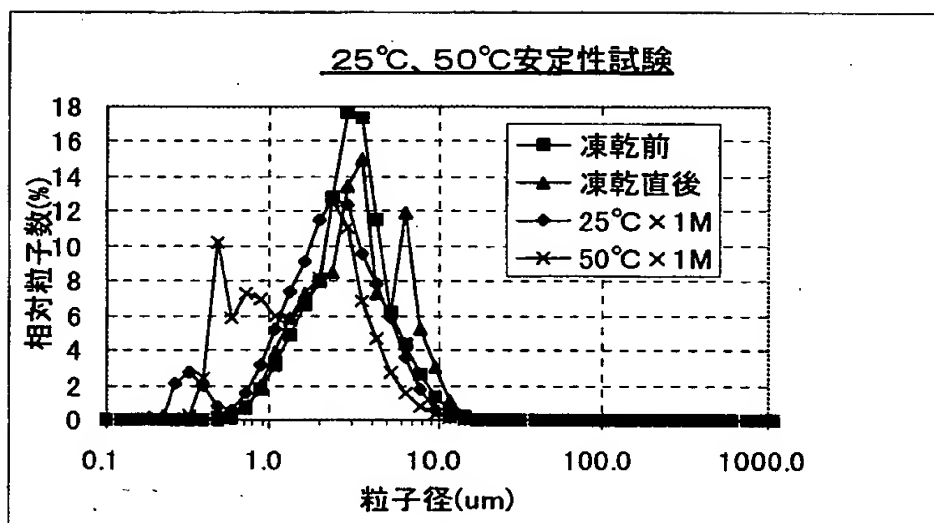
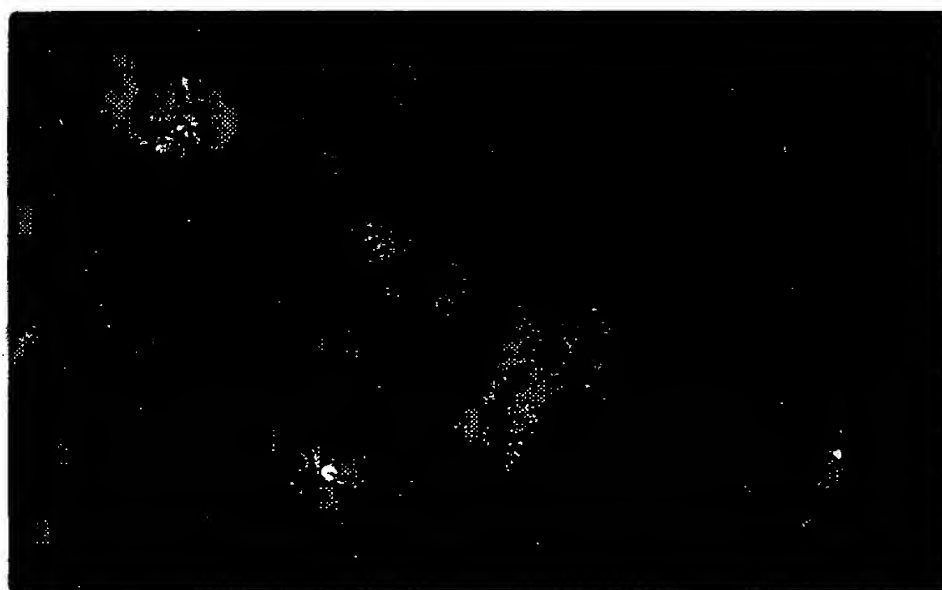


図 10



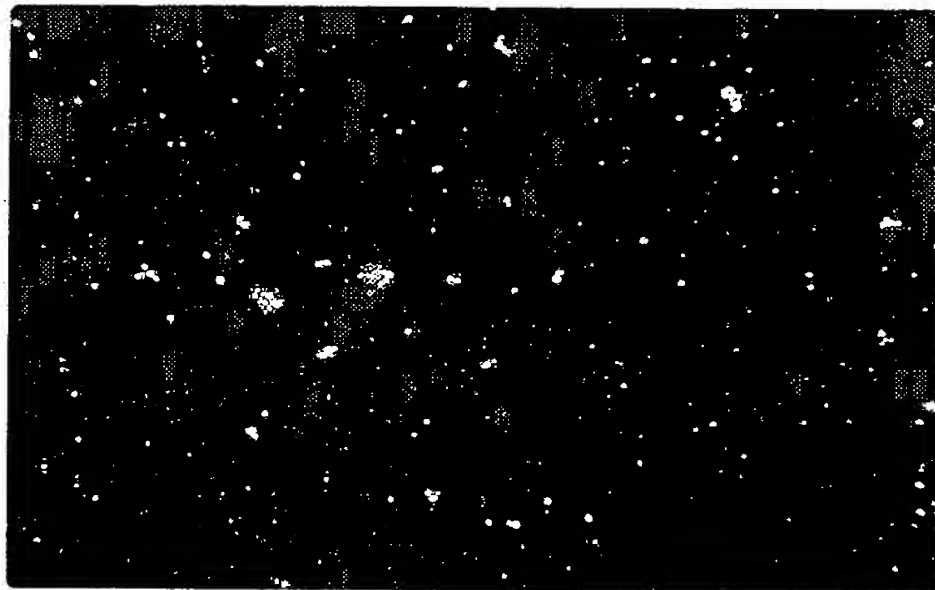
× 400

0 50 100 μm

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/8

図 1 1



×400

0 50 100 μ m

図 1 2



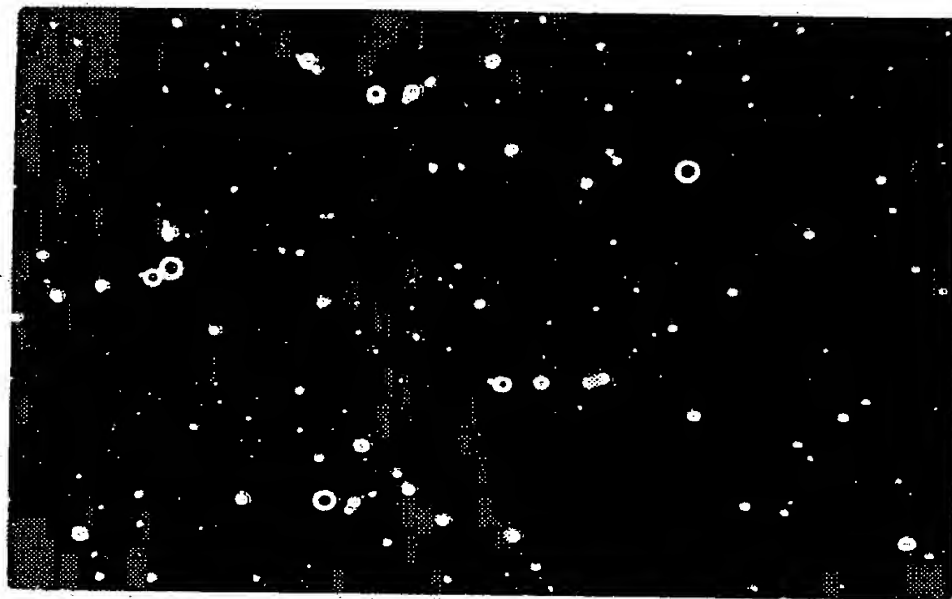
×400

0 50 100 μ m

THIS PAGE BLANK (USP

7/8

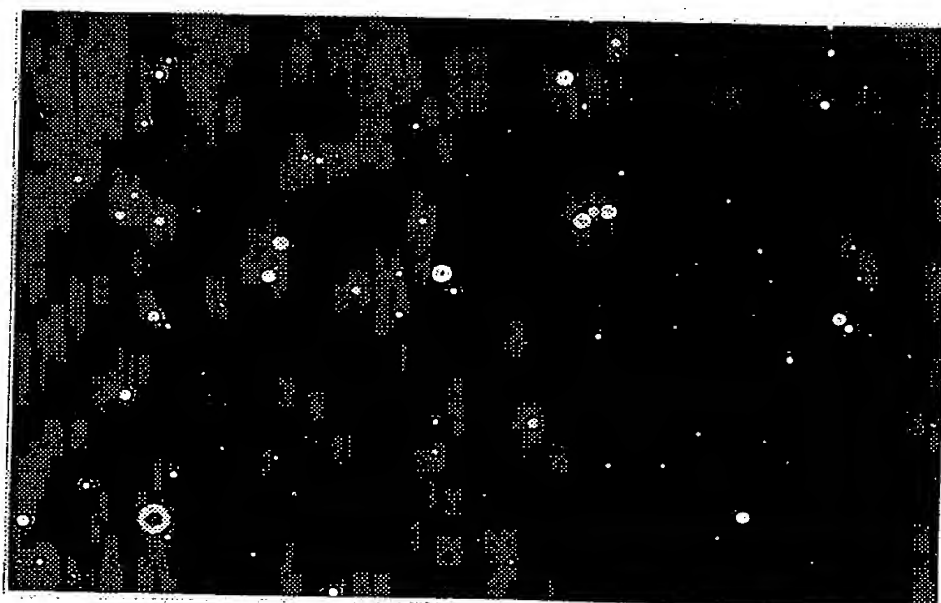
図 1 3



× 4 0 0

0 50 100 μ m

図 1 4



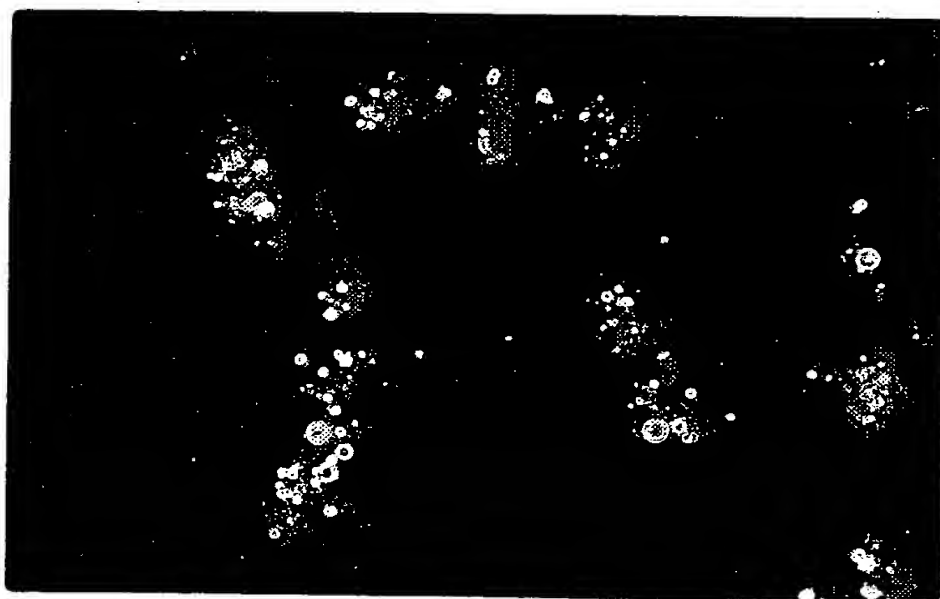
× 4 0 0

0 50 100 μ m

THIS PAGE BLANK (USPT

8/8

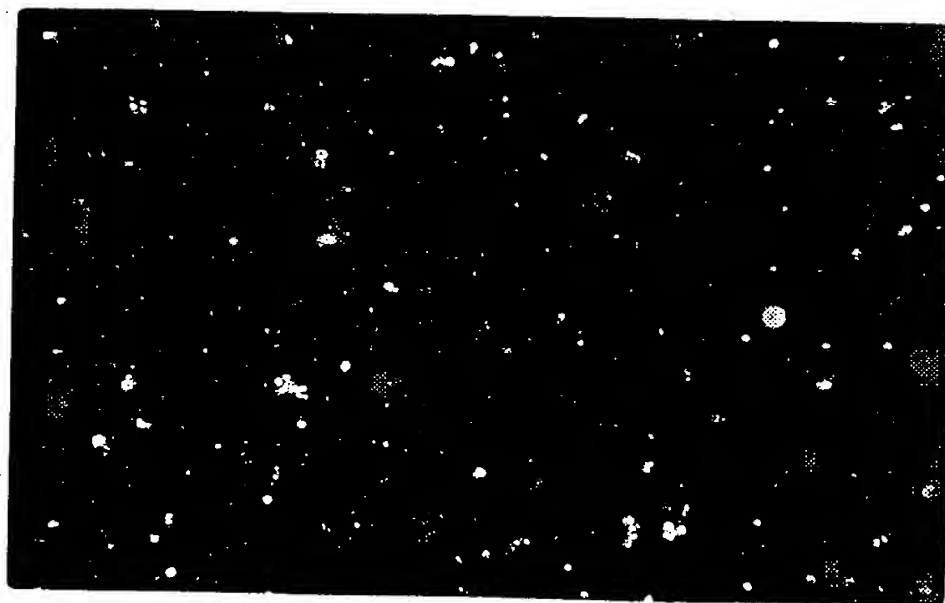
☒ 1 5



× 4 0 0

0 50 100 μ m

☒ 1 6



× 4 0 0

0 50 100 μ m

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/03837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ A61K35/74, 39/04, 9/07, 47/16, 47/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ A61K35/74, 39/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 54-28813, A (Yuichi Yamamura), 3 March, 1979 (03. 03. 79) & GB, 2002229, A & DE, 2834893, A	1-3, 6-8 4, 5, 9-20
X Y A	WO, 96/14871, A1 (CORTECS LTD.), 23 May, 1996 (23. 05. 96) & EP, 792165, A1 & JP, 10-508834, A	11, 15 12, 13 13-20
Y	JP, 60-1133, A (Ribi Immunochem Research Inc.), 7 January, 1985 (07. 01. 85) & DE, 3323093, A & GB, 2122896, A & FR, 2536280, A	12, 13
Y	US, 4436728, A (RIBI IMMUNOCHEM RES), 13 March, 1984 (13. 03. 84) & JP, 58-222025, A & FR, 2527443, A & GB, 2122083, A & DE, 3318567, A	12, 13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 7 October, 1999 (07. 10. 99)	Date of mailing of the international search report 26 October, 1999 (26. 10. 99)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03837

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 60-120817, A (Ribi Immunochem Research Inc.), 28 June, 1985 (28. 06. 85) & GB, 2149301, A & DE, 3434766, A & US, 4663306, A	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K35/74, 39/04, 9/07, 47/16, 47/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K35/74, 39/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	J P, 54-28813, A (山村 雄一) 3. 3月. 1979 (03. 03. 79) & GB, 2002229, A & DE, 2834893, A	1-3, 6-8 4, 5, 9-20
X Y A	WO, 96/14871, A1 (CORTECS LTD.) 2 3. 5月. 1996 (23. 05. 96) & EP, 792165, A1 & J P, 10-508834, A	11, 15 12, 13 13-20
Y	J P, 60-1133, A (リビ イムノチエム リサーチ, イン コーポレイテッド) 7. 1月. 1985 (07. 01. 85)	12, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 10. 99

国際調査報告の発送日

26.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4 C 9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	& DE, 3323093, A & GB, 2122896, A & FR, 2536280, A US, 4436728, A (RIBI IMMUNOCHEM R ES) 13. 3月. 1984 (13. 03. 84) & JP, 58-222025, A & FR, 2527443, A & GB, 2122083, A & DE, 3318567, A	12, 13
A	JP, 60-120817, A (リビ イミュノケム リサーチ, インコーポレイテッド) 28. 6月. 1985 (28. 06. 8 5) & GB, 2149301, A & DE, 343476 6, A & US, 4663306, A	1-20